

PAT-NO: JP405296978A

DOCUMENT-IDENTIFIER: **JP 05296978 A**

TITLE: ELECTROPHORETIC DEVICE

PUBN-DATE: November 12, 1993

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

TAKAHASHI, SATOSHI

KANBARA, HIDEKI

INT-CL (IPC): G01N027/447, C12M001/34 , G01N021/64 ,
C12M001/00 , C12Q001/68

ABSTRACT:

PURPOSE: To obtain an electrophoretic device which can easily measure a sample subjected to molecular-weight separation with high sensitivity by measuring fluorescence or light absorption.

CONSTITUTION: Two capillaries 1 and 2 filled with a gel are coaxially fixed in a fluorescent cell 4 so that a fixed gap 3 can be maintained between them. An electrophoretic passage is constituted through the gap 3 by injecting a buffer solution into the cell 4 so that the gap 3 can be filled with the buffer solution. Fluorescence or light absorption measurement is performed in the gap 3. Since the optical measurement is performed outside the gel, a highly sensitive electrophoretic device which can make fluorescence or light absorption measurement in such a state that the measurement is hardly affected

by background light can be obtained. In addition, a fluorescence or light absorption measuring section composed of an electrolyte can be easily constituted without deteriorating the molecular weight separation ability when the gel makes electrophoresis.

COPYRIGHT: (C)1993, JPO&Japio

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-296978

(43)公開日 平成5年(1993)11月12日

(51)Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

G 0 1 N 27/447

C 1 2 M 1/34

G 0 1 N 21/64

Z

Z 9115-2 J

7235-2 J

7235-2 J

G 0 1 N 27/ 26

3 2 5 A

3 1 5 B

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全 11 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平4-106966

(22)出願日

平成4年(1992)4月24日

(71)出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72)発明者 高橋 智

東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(72)発明者 神原 秀記

東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔

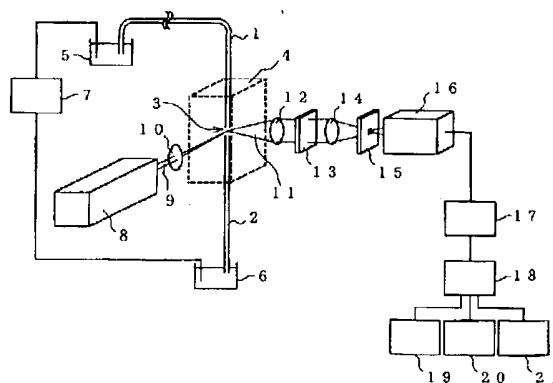
(54)【発明の名称】 電気泳動装置

(57)【要約】

【目的】 分子量分離される試料を簡便で高感度に蛍光または光吸収測定することのできる電気泳動装置を提供する。

【構成】 ゲルを充填した2本のキャピラリー1及び2が同軸で且つ一定のギャップ3を保持するように蛍光セル4に固定する。蛍光セルに緩衝液を注入し、ギャップ3を緩衝液で満たすことで、ギャップ3を介した泳動路を構成する。このギャップ3で蛍光または光吸収測定を行う。

【効果】 光学測定をゲルの外で行うことにより、背景光の影響の少ない高感度な蛍光または光吸収計測が可能な電気泳動装置が実現できる。また、ゲル電気泳動での分子量分離性能を損なうことなく、電解液からなる蛍光または光吸収測定部を容易に構成できる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 電源によって直流電圧を印加された陰極電極槽と陽極電極槽の間に光学セルを貫通する泳動路を形成し、少なくとも前記光学セルの上流側泳動路がキャピラリーで規定されている電気泳動装置であって、前記キャピラリーの一端を前記泳動路に直交する方向の内部寸法が前記泳動路の径より大きく内部に電解液を満たした光学セル中に終端させ、前記光学セル中における前記キャピラリー外の泳動路を光学的検出部とし、該光学的検出部に光源から光照射して試料の検出を行うことを特徴とする電気泳動装置。

【請求項2】 前記電気泳動路の試料分離部をキャピラリーゲルで構成することを特徴とする請求項1記載の電気泳動装置。

【請求項3】 一端がそれぞれ前記陰極電極槽または陽極電極槽に接続された一対のキャピラリーの他端を前記セル中にその軸をほぼ一致させ一定のギャップを形成して対向させて配置し、該ギャップを前記光学的検出部とすることを特徴とする請求項1または請求項2記載の電気泳動装置。

【請求項4】 前記ギャップの長さが1mm以下であることを特徴とする請求項3記載の電気泳動装置。

【請求項5】 複数のキャピラリー対によって形成される複数の光学的検出部を単一の光学セル中に配置し、前記複数の光学的検出部が互いに電解液を介して連結していることを特徴とする請求項3または請求項4記載の電気泳動装置。

【請求項6】 前記光学的検出部は試料から発せられる蛍光を検出するものであることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載の電気泳動装置。

【請求項7】 前記光学的検出部は試料による光吸収を測定するものであることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載の電気泳動装置。

【請求項8】 複数のキャピラリー対によって形成される複数の光学的検出部が一直線上に位置するように前記複数のキャピラリー対を整列して配置し、全ての光学的検出部を同時に照射するように単一の励起光を前記直線に沿って照射して各キャピラリーに注入された試料から発せられる蛍光を同時に検出することを特徴とする請求項5記載の電気泳動装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、核酸、蛋白、糖等を分離分析する電気泳動装置に関し、特にDNA（核酸）等の検出に好適な電気泳動装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】蛍光標識された試料を電気泳動により分子量分離し、解析する電気泳動装置としては、例えば蛍光体を標識物にしたDNAの塩基配列決定装置がある。

塩基配列決定方法は、周知のサンガー（Sanger）

らのジデオキシ法による。つまり、解析するDNAをベクターに導入して増幅し、変性させて一本鎖の鋳型DNAをつくる。この鋳型DNAにプライマーDNAを結合させ、プライマーDNAを起点とした相補鎖合成を行わせる。この際、4種のデオキシヌクレオチド三リン酸の他に、ターミネーターとなる特定の1種のジデオキシヌクレオチド三リン酸を加えておく。このジデオキシヌクレオチド三リン酸が取り込まれたときに相補鎖合成が止まるため、特定の塩基で止まった種々の長さのDNA断片が得られる。そこで、アデニン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）、チミン（T）の4種の塩基に対するジデオキシヌクレオチド三リン酸つまりddATP、ddCTP、ddGTP、ddTTPを使い、それぞれ上記の相補鎖合成反応を行わせることで、末端塩基がそれぞれA、C、G、Tである種々の長さのDNA断片を得、これらを分子量分離し、分子量順に塩基種を読むことで塩基配列が解析できる。分子量分離は、ポリアクリルアミドゲルを使った電気泳動で行う。

【0003】この方法に基づいた自動化装置は、主に電気泳動部と解析部を自動化したものである。例えば「ネイチャー」誌、第321巻、第674～679頁（1986年）（Nature、321、674～679（1986））に記載されている装置では、DNA断片の末端塩基の種類毎に4種の異なる蛍光体（フルオレセイン、4-クロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1-ジアゾール（NBD）、テトラメチルローダミン、テキサスレッド（モレキュラプローブ社製品））で標識し、内径が1～2mmのガラス製チューブを泳動路として泳動し、分子量順に泳動されてくる断片をレーザー光で励起して蛍光検出することで、塩基配列を決定する。4種の蛍光体の最大蛍光波長は、520nm、550nm、578nm、605nm付近であり、それぞれの波長域を透過させる4種のバンドパス干渉フィルタによって各々の蛍光を分離して検出している（第1の従来例）。また、内径が100μm以下のキャピラリーにゲルを作成して電気泳動部とする方法がある。例えば「ニュークレイック アシッド リサーチ」誌、第18巻、第1415～1419頁（1990年）（Nucleic Acid Research、18、1415～1419（1990））に記載の方法では、図6に示すように、内径75μmのキャピラリーを使用し、9kVの高電圧を印加することで、DNA断片等の高速及び高分離検出を図っている。この方法の検出部は、キャピラリーの軸とレーザー光の照射軸とを、垂直方向から25度程度傾斜させ、レーザー光をキャピラリーの中心部に直径約20μmに集光して照射し、生じる蛍光をバンドパス干渉フィルタ等で分光して検出している（第2の従来例）。なお、図6は上記従来例記載の装置を判りやすく改変したものである。

【0004】さらに、「ジャーナル オブ クロマトグ

ラフィー」誌、第516巻、第61～67頁(1990年)(Journal of Chromatography、516、61～67(1990))にも、キャピラリーゲル電気泳動法によってDNAの塩基配列を決定する方法が記載されている。この方法では、内径が50 μ mのキャピラリーを使用してDNA断片を分子量分離している。本例での測定装置は基本的には「サイエンス」誌、第242巻、第562～564頁(1988年)(Science、242、562～564(1988))に記載されているものである。「サイエンス」誌記載の装置に、判り易くするため、レーザ光源やシースフロー用のポンプ等を加えて編集した装置構成を図7に示した。DNA断片の検出は、分子量分離された分離液を石英製フローチャンバー(内形250 μ m \times 250 μ m)に導き、緩衝液をシース液としてポンプによりフローさせてシースフロー状態にし、フローチャンバーのほぼ中心部を流れる分離液に対して、レーザ光を直径10 μ m程度に集光して照射し、分光フィルタ等を通してDNA断片からの蛍光を検出している(第3の従来例)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】電気泳動装置では、試料の微量化等に伴い、検出の高感度化が望まれている。一般に、電気泳動状態での蛍光測定では、目的とする蛍光体自体からの蛍光の他に、背景光として、ゲルによる励起光の散乱光(レーラー散乱など)及び蛍光、ゲルの支持体例えばキャピラリーの内壁及び外壁での散乱光、あるいはキャピラリー自体からの蛍光が生じる。そのため、バックグラウンドレベルが高くなり、検出感度の低下を招くことになる。つまり、高感度な蛍光検出を達成するには、このような背景光をいかに除去するかが重要な課題となる。

【0006】上記第1の従来例では、バンドパス干渉フィルタにより励起光(散乱光)と蛍光とを分離している。しかし、干渉フィルタの特性上散乱光を完全に分離することは困難である。また、ゲル及びガラス製チューブ自体からも微弱ながらも蛍光が生じることがあり、バンドパス干渉フィルタ等の分光のみでは十分に背景光を除去することは困難である。

【0007】第2の従来例では、バンドパス干渉フィルタ等で分光して蛍光検出することに加えて、キャピラリーの軸をレーザ光の照射軸と蛍光集光軸とを含む平面に対して垂直から25度程度傾斜させることで、レンズで集光されるキャピラリーからの散乱光の割合を少なくしている。しかし、背景光の除去は十分とはいえない。例えば、キャピラリーはその断面が円であり、励起光が散乱しやすい形状である。また、キャピラリー径が小さいために散乱光の発生するキャピラリー内壁や外壁と試料からの蛍光が発生する位置とが非常に近接し、空間的に両者を分離することが困難になる。さらに、ゲルによる

散乱光・蛍光は上記方法では除去できない。また、泳動方向に濃縮されてくる試料に対して斜めに励起光が照射されるため、分離能が悪くなりやすいという問題もある。

【0008】第3の従来例では、キャピラリーゲル端をシースフローチャンバーのサンプル注入口とすることで、キャピラリーゲル外に試料液を導出させ、シースフロー下で蛍光測定を行うため、キャピラリー界面での散乱光並びにゲルからの散乱光及び蛍光の発生がなくなる。また、シースフローチャンバーでは、試料液はそのほぼ中心を層流状態で流れ、フローチャンバーの内壁と接触しないため、フローチャンバーからの散乱光と試料からの蛍光とを空間的に分離することができ、蛍光強度を高感度に検出することができる。しかし、シースフローを形成するために、緩衝液をシース液として液体クロマトグラフィー用ポンプ等でシースフローチャンバー内に一定流量で常時フローさせる必要がある。そのため、装置的に高価で、複雑になる等の問題がある。

【0009】本発明の目的は、上記した従来技術の問題点を解決し、電気泳動により分離される試料の蛍光測定または光吸収測定を高感度で簡便に行うことのできる電気泳動装置を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために、本発明は、蛍光体で標識された核酸断片等の試料を電気泳動により分子量分離し、分子量分離された前記試料を光学的に検出して試料を解析する電気泳動装置において、電気泳動路を、ゲルを充填した分子量分離部と、電解液で満たされた光学的検出部とで構成する装置を提供するものである。

【0011】上記の分子量分離部はキャピラリーゲルで構成することが望ましい。また、電解液で満たされた光学的検出部は、2本のキャピラリーをその軸をほぼ一致させて直線的に配置し、相対向するキャピラリー端をキャピラリーの軸方向に一定のギャップを保って密接させることによって形成することができる。この場合、少なくとも電気泳動路の上流側に位置する一方のキャピラリーが分子量分離部となり、ギャップの空間部が光学的検出部となる。この光学的検出部において試料による蛍光、あるいは光吸収を測定する。

【0012】また、ギャップの長さを1mm以下になるように構成するものである。なお、ギャップは、電気泳動路の径より大きな内部寸法を有する光学セル内部に保持することが望ましい。また、複数のキャピラリー対によって形成される複数の光学的検出部が、互いに電解液を介して連結されるように構成することもできる。

【0013】さらに、複数本のキャピラリーによる複数の光学的検出部を1列に配置し、単一の励起光をこの列方向に照射して上記複数の光学的検出部を同時に照射することにより、上記複数の光学的検出部で同時に蛍光測

定を行うように構成することもできる。

【0014】

【作用】蛍光体で標識された核酸断片等の試料を電気泳動により分子量分離し、分子量分離された前記試料を光学的に検出して試料を解析する電気泳動装置において、電気泳動路を、ゲルを充填した分子量分離部と、ゲル外部の電解液で満たされた光学的検出部とで構成し、試料の蛍光または光吸収測定をゲルの無い電解液中で行うことで、ゲルによる散乱光及び蛍光、並びにキャピラリー等のゲル支持体からの散乱光及び蛍光の発生を回避することができ、高感度な蛍光または光吸収検出が可能となる。しかも、電解液を機械的にフローさせる必要が無く、簡便な装置構成となる。なお、ゲルからなる分子量分離部を設けることで、従来通り、電気泳動による分子量分離を行うことができる。

【0015】なお、分子量分離部をキャピラリーゲルで構成することによって、高速分離が可能になる。また、2本のキャピラリーをその軸をほぼ一致させて直線的に配置し、相対向するキャピラリー端をキャピラリーの軸方向に一定のギャップを保って密接させることにより、簡便に分子量分離部と光学的検出部を構成することができる。この場合、上記ギャップ空間が試料の蛍光または光吸収を測定する光学的検出部となり、このギャップ空間に電解液を満たすことで電気泳動が可能になり、ゲル及びキャピラリーからの散乱光等の背景光を除くことができる。また、少なくとも一方のキャピラリーにゲルを作成することで容易に分子量分離部が構成できる。

【0016】ギャップ長は0.1mmから1mmとするのが好ましい。一般にギャップ長を短くすればするほど試料がギャップ空間を泳動しやすくなるため、基本的にギャップ長は短い方が好ましい。しかしながら、装置を組立てる上で、ギャップ長が短すぎるとその調整が難しくなるため、通常現実的には0.1mm以上が好ましい。ただし、0.1mm以下に設定することも可能であって、その限界は、ギャップ部でのレーザ光等の励起光束の幅により決定される。また逆に、ギャップ長を長くすると、試料はギャップ空間を直線的に泳動せずに、ギャップ部を拡散し、他方のキャピラリー等に泳動されなくなる。ギャップ長が2~3mm程度であれば、試料が正常に泳動できることを確認したが、泳動電圧等の条件によっては正常に泳動しなくなるため、実際的にギャップ長は1mm程度以下が好ましい。つまり、ギャップ長を0.1mmから1mmとすることで、試料を簡便に効率よく電気泳動させることができる。

【0017】また、ギャップを形成するキャピラリー端を、電気泳動路の径より大きな内部寸法、例えばキャピラリーの外径より大きな光路長及び光路幅を有する光学セル内部に保持し、その内部を電解液で満たして試料を電気泳動させることにより、試料はキャピラリーとキャピラリーとを結ぶ線上を泳動し、光学セル内面と接触し

ないため、セル内面への吸着、及びセル内面からの散乱光の影響を除去することができ、検出感度を向上させることができる。

【0018】また、複数のキャピラリー対の各ギャップ空間によって形成される複数の光学的検出部を、1つの光学セル内部に保持するなどして互いに電解液を介して連結させることにより、同時に複数の試料をほぼ同一条件で検出することが可能になる。さらに、複数のキャピラリー対を1列に配置することで、試料から発せられる蛍光を測定する光学的検出部が列状に形成され、単一の励起光により複数の光学的検出部を同時に照射して同時に蛍光測定することが可能になる。さらに、複数の光学的検出部を互いに電解液を介して連結させることにより、光散乱の少ない電解液を通して励起光を効率良く各光学的検出部に導くことができ、高精度に蛍光を検出することができる。

【0019】

【実施例】以下、実施例により本発明をより詳細に説明する。

20 【実施例1】本実施例では、蛍光標識したDNA断片を電気泳動により分子量分離し、蛍光によって検出を行う。標識用の蛍光体として、フルオレセイン・イソチオシアネート(FITC)を使用する場合について説明する。

30 【0020】図1に、本実施例の電気泳動装置の構成図を示す。内径100 μ m、外径375 μ m、長さ30cmのシリカ製のキャピラリー1及びそれと同じ内外径を有する長さ5cmのシリカ製のキャピラリー2の2本を使用する。キャピラリー1には、変性剤の尿素を含む5%ポリアクリルアミドゲルを作成する。まず、キャピラリー内部を洗浄し、シランカップリング処理する。次いで、脱気した4.75%のアクリルアミド、0.25%のビスアクリルアミド、7Mの尿素、2mMのEDTAを含むトリス、ほう酸緩衝液にテトラメチルエチレンジアミン、過硫酸アンモニウム溶液を加えキャピラリーに注入して重合させ、アクリルアミドゲルを作成する。キャピラリーはシランカップリング処理されているため、アクリルアミドゲルとキャピラリーとは化学的に結合しており、泳動時にキャピラリーからゲルがはみでることがない。

40 【0021】また、キャピラリー2はその内面が正の電荷を有するように調整する。まず、キャピラリーに3-(2-アミノエチルアミノプロピル)トリメトキシシラン溶液を注入して反応させ、110℃で熱処理して、キャピラリー内面をアミノシラン化して正の電荷を有するようにする。このようにすることでキャピラリー2内部の電気浸透流の向きが負極から正極の向きになり、アクリルアミドゲルを充填したキャピラリー1での試料の泳動方向(負極→正極)と、キャピラリー2での試料の移動方向(負極→正極)が一致し、試料の泳動が容易にな

る。

【0022】このキャピラリー1及び2のそれぞれの一端を、光学セル内部に対向保持して試料を光学的に検出する。ここでは蛍光により試料を検出するため、光学セルとして蛍光セルを使用する。つまり、上記キャピラリー1及び2のそれぞれの一端を角形の石英製蛍光セル4（外形3mm角、内形1mm角）内部に、同軸に且つ0.1mmのギャップ3を形成して対向させて保持し、ギャップ空間を光学的検出部とする。なお、キャピラリー1及びキャピラリー2のそれぞれの他端は、緩衝液（トリス、ほう酸、EDTAを含む緩衝液）を入れた陰極側電極槽5及び陽極側電極槽6に浸す。また、石英製蛍光セル4内部にグリセリンを含む緩衝液を注入して、ギャップ3を緩衝液で満たし、高電圧電源7により、陰極側電極槽5と陽極側電極槽6の間に直流高電圧を印加する。

【0023】電圧印加により、キャピラリー2、ギャップ3、及びキャピラリー1内を電流が流れる。ギャップ3の長さは短く、ギャップ3ではキャピラリー2とキャピラリー1の軸を結んだ線上を中心に電流が流れる。そのため、電気泳動される試料もキャピラリー1から流れ出て、ギャップ3内をあまり拡散することなく通過し、キャピラリー2に流れ込むことになる。つまり、試料は蛍光セル4の内面に接触せずに泳動することになる。なお、蛍光セル4内部つまりギャップ3にはグリセリンを含む緩衝液を注入したが、グリセリンの添加は、緩衝液の粘度が高まることによる対流の影響の低減、及びギャップ3での電界強度の向上を目的とするものである。緩衝液の対流を抑え、また電界強度を高めることにより、試料のギャップ3内での拡散が抑えられ、試料をキャピラリー1からキャピラリー2に容易に確実に泳動させることができるようになる。

【0024】本例では上記目的のためにグリセリンを使用した。が、粘性が高く電気泳動に使用できる物質であれば同様に使用できる。例えば、ポリエチレングリコール、シュクロースなどが使用できる。なお、ギャップ3が狭ければ、グリセリン等を含まない通常の緩衝液でも十分使用可能である。試料である蛍光標識DNA断片の導入は、陰極側のキャピラリー1の端を一時的に試料液に浸し、試料液と陽極側電極槽6の間に5kVの電圧を20秒間程度印加することで行う。その後キャピラリー1の端を元の陰極側電極槽5に戻し、陰極側電極槽5と陽極側電極槽6の間に10kVの直流電圧を印加すると、試料はキャピラリー1内で陰極側から陽極側に向かって分子量分離されつつ泳動され、ギャップ3を通過する。

【0025】ギャップ3を通過するDNA断片に対して、アルゴンレーザ光源8の波長488nmのレーザ光9をレンズ10により20μm程度に絞って照射する。DNA断片から発せられた蛍光11は、レーザ光照射方

向と垂直方向からレンズ12で集光され、干渉フィルタ13で散乱光などの背景光を除去され、レンズ14でスリット15に結像される。スリット15を通過する光を光電子増倍管16で検出し、増幅器17で増幅し、コンピュータ等のデータ処理装置18で泳動パターン等処理し、それらの結果をモニタ19、プリンタ20に出力し、またメモリ21に保存する。

【0026】干渉フィルタ13としては、FITCからの蛍光を効果的に検出するため、500nm～540nmの波長域を通過するバンドパス干渉フィルタを使用する。また、像倍率が等倍になるようにレンズ系12、14を構成する。そしてスリット15の開口部を泳動方向に50μm、レーザ光照射方向に100μmとし、ギャップ3における蛍光像が開口部の中心にくるように調整する。試料はギャップ3の近傍のみを泳動するため、このように光学系を構成することで、レーザ光の石英製蛍光セル4部での散乱光はスリット15の開口部に結像されず光電子増倍管16で検出されなくなる。また、キャピラリー及びゲルからの散乱光、蛍光も発生しないため、背景光強度が大幅に低減する。

【0027】図2は、蛍光セル部の拡大断面図である。石英製蛍光セル4は、キャピラリー保持具23a及び23bで押さえられて固定される。また、蛍光セル4と保持具23a及び23bの間に、シリコンゴムパッキン22a及び22bを挟むことにより、液漏れを防ぐ構造とする。キャピラリー1は四ふつ化エチレン樹脂製のフェラル24aと押しネジ25aで、キャピラリー保持具23aに固定する。同様にキャピラリー2もフェラル24bと押しネジ25bで固定する。キャピラリー1とキャピラリー2の間隔は、キャピラリーのフェラルからの長さを規定することで自由に調整することができ、本実施例では前述のように0.1mmとする。なお、蛍光セル部には別に緩衝液などを注入するための導入口が設けられており、また、それにはバルブ26a及び26bが接続されている。これは、キャピラリーを固定した後、蛍光セル4内に緩衝液を満たすのに使用される。なお、緩衝液等の導入口は蛍光セルの保持具の部分に設けることもできる。

【0028】本実施例の装置により、蛍光標識DNA断片計測を試みる。蛍光標識DNA断片は、周知のサンガー（Sanger）らのジデオキシ法により、蛍光標識したプライマーを使い、DNAポリメラーゼ反応を行うことで調製する。プライマーとして、フルオレセイン・イソチオシアネート（FITC）が結合したプライマー（標識プライマー）を使用する。まず、一本鎖DNAに標識プライマーを加え、アニールして、一本鎖DNAに標識プライマーを結合させる。次にdATP、dTTP、dCTP、dGTP及びddATPを加え、DNAポリメラーゼ反応を行わせる。以上の操作で、末端がAの種々の長さの蛍光標識DNA断片を得る。

【0029】上述のように試料をキャピラリーに導入し、ギャップ空間での蛍光強度を測定することで、DNA断片の分子量分離パターンを計測することができる。しかも、図6の従来例のようにギャップを形成させることなく蛍光検出する場合、例えば、長さ35cmの同様の形状のキャピラリーを使い、泳動距離が30cmのところのキャピラリーの保護膜をはがし、この部分で蛍光検出する場合に比べ、本実施例では、検出される背景光強度が1/10程度以下になり、より低濃度の試料を検出できるようになる。

【0030】本実施例によれば、ゲルを使用して分子量分離特性を損なうことなく、高感度に試料を検出することができるようになる。しかもポンプ等を使って緩衝液をフローさせることなく、蛍光検出用の蛍光セル内の特定の部分のみに試料を泳動させることができ、簡便に装置を構成することができる。なお、使用するレーザ装置及び蛍光体は、アルゴンレーザ及びFITCに限られるものではなく、任意の蛍光体及び適当なレーザ装置が使用できる。また、1種の蛍光体だけでなく、同時に2種以上の蛍光体からの蛍光を検出することも可能である。その場合には、例えば図1においてレンズ12、干渉フィルタ13、レンズ14、スリット15及び光電子増倍管16からなる光検出装置の組を蛍光体の数に一致する数だけ設け、それぞれが別々の波長域の蛍光を検出するようにすればよい。または、蛍光を分光器に導き、ラインセンサで受光することによっても可能である。

【0031】この装置を応用することで、DNAの塩基配列も決定できる。つまり、末端塩基の種類毎に、異なる蛍光体で標識したプライマーを使用し、それぞれDNAポリメラーゼ反応を行わせた後、反応液を混合し、電気泳動させる。そして、ギャップ空間を通過するDNA断片の蛍光を検出し、そのときの蛍光体の種類を識別することで塩基種が同定でき、塩基配列が決定できる。なお、蛍光体の種類を識別するには、図1において前述のように4種の蛍光波長域を検出する4組の光検出装置を設ける等すればよい。

【0032】なお、本実施例では、DNA断片の測定を例にして説明したが、蛋白、糖等の分析にも当然のことながら使用できる。また、本実施例では2本とも同じ内径のキャピラリーを使用した。異なる内径のキャピラリーの組合せも可能である。例えば、キャピラリー1の内径よりキャピラリー2の内径を細くすれば、キャピラリー1端から泳動される試料がキャピラリー2に導入される時に絞られるため、試料液の濃度が高くなり、より高感度に検出することができる。またキャピラリー1の内径よりキャピラリー2の内径を太くすれば、キャピラリー1端から泳動される試料をより容易にかつ確実にキャピラリー2に導入させることができる。

【0033】さらに、本実施例によれば、励起光をキャピラリー部を透過させることなく試料からの蛍光を測定

できることから、キャピラリーが透明である必要はない。つまりキャピラリーの被覆を除去する必要がないため、取り扱いが容易になる。さらに四ふつ化エチレン樹脂や三ふつ化塩化エチレン樹脂などの不透明なふつ素樹脂製のキャピラリー等種々の材質のキャピラリーを使用することも可能となる。ふつ素樹脂製のキャピラリーは試料の吸着が少ないため、表面処理等の処理操作が不要であり、また破損がないため、操作性が向上する。また耐薬品性に優れるので、幅広いpH範囲の溶媒を使用することが可能になる。

【0034】〔実施例2〕次に、キャピラリーを4本並べて同時に蛍光検出する装置について説明する。図3は、本実施例の電気泳動装置の蛍光検出部の構成図である。27a、27b、27c及び27dは内径100μm、外径375μm、長さ30cmのシリカ製のキャピラリーであり、一端は（省略しているが）図1と同様に陰極側電極槽に浸されている。また同様に、28a、28b、28c及び28dは上記と同じ内外径を有する長さ5cmのシリカ製のキャピラリーであり、一端が陽極側電極槽に浸されている。

【0035】これらのキャピラリーには、第1の実施例と同様の手法で変性剤の尿素を含む5%ポリアクリルアミドゲルを作成する。また各キャピラリーにはシランカップリング処理を施し、アクリルアミドゲルとキャピラリーとを化学的に結合させ、泳動時にキャピラリーからゲルがはみでないように配慮する。この27a～27dのキャピラリーと28a～28dのキャピラリーは、角形の石英製蛍光セル30の内部に、第1の実施例と同様に一定間隔のギャップ29a～29dを保持して固定され、複数の光学的検出部を形成する。

【0036】キャピラリーの固定は、ふつ素樹脂、例えば四ふつ化エチレン樹脂製のブロックに一直線上に1mm間隔で4箇所の垂直孔を設けたキャピラリー保持具42及び43を使う。4箇所の垂直の孔に、1本ずつキャピラリーを差し込み、27aと28a、27bと28b、27cと28c、27dと28dがそれぞれ同軸になるようにし、また、ギャップ29a～29dの長さがそれぞれ0.2mmになるように調整する。

【0037】蛍光測定時には、石英製蛍光セル30内部にグリセリンを含む緩衝液を注入し、ギャップ29a～29dを緩衝液で満たす。この状態で電圧を印加すると、キャピラリー27aに導入された試料はギャップ29aへ、次にキャピラリー28aへと泳動していく。他のキャピラリーに導入された試料も同様に泳動される。なお、緩衝液中のグリセリンは第1の実施例と同様にギャップ部の緩衝液の対流を抑え、試料をキャピラリー27a～27dからキャピラリー28a～28dへ確実にかつ容易に泳動させるために使用される。

【0038】ギャップ29a～29dを通過するDNA断片の蛍光検出は次のように行う。まず、蛍光体励起用

11

のレーザ光源31からのレーザ光32をレンズ33により絞り、複数の光学的検出部即ちギャップ29a~29dを同時に照射するようにする。焦点の位置は、ギャップ29bと29cの中間に設定し、ギャップ29a~29dの間で照射スポットサイズが最大直径100μmとなるように調整する。例えば、レンズ33として焦点距離が150mm程度のレンズを使用することでギャップ29a~29dをほぼ同じスポットサイズで照射することができる。

【0039】各ギャップを通過するDNA断片から発せられた蛍光44は、レーザ光照射方向と垂直の方向からレンズ34で集光し、干渉フィルタ35で散乱光などの背景光を除去し、レンズ36で集光し、CCDカメラやホトダイオードアレイ等のラインセンサ37面に結像させる。ラインセンサ37の出力から、コンピュータ等のデータ処理装置38で泳動パターン等のデータ処理を行い、それらの結果をモニタ39、プリンタ40に出力する。また、データはメモリ41に保存する。

【0040】レーザ光として波長488nmのアルゴンレーザ光を、試料としてFITC溶液を使用し、各キャピラリー27a~27d内を連続的に泳動させる。光学的検出部であるギャップ空間を泳動する試料の蛍光像をラインセンサ37で検出すれば、ギャップ29a~29dの4箇所、つまり各泳動路に対応する光学的検出部では、互いに他の光学的検出部と独立して強い蛍光が検出されることになる。ラインセンサ上の各泳動路に対応する部分の信号強度を計測することで、それぞれのキャピラリーを泳動する試料を連続的にさらに同時に検出することができる。

【0041】本実施例により、複数の光学的検出部において同時に、またほぼ同一条件で泳動する試料からの蛍光を検出することができ、例えば、DNAの塩基配列決定、多試料DNAの塩基配列同時決定、蛍光体を利用した側鎖あるいは官能基の解析、液体クロマトグラフィーで分離された試料の詳細な解析等の多項目にわたる解析が可能となる。また、レンズ等の蛍光集光部が1個で済むため、安価にしかも小型に構成することができる。

【0042】さらに、本実施例のようにキャピラリー対を1列に配して各ギャップ空間を一直線上に並べ、レーザ光をキャピラリーの存在しない各ギャップ空間に沿って照射することにより、レーザ光がキャピラリーによる散乱または屈折を受けないため、各ギャップ空間をほぼ同一強度、同一照射スポットサイズで照射することができ、効率よく複数の試料を励起することができ、複数の試料を高感度に検出する装置を簡便に構成することができる。ギャップ部を設けずに複数のキャピラリーを並べて同様の蛍光検出を行う場合、例えば、図6の従来例と同様なキャピラリーを複数本使用し、被覆を除去した部分をレーザ光の照射軸上に順に並べて蛍光検出を行うような場合、個々のキャピラリーを通過する度にレー

12

ザ光が散乱または屈折をうけ、レーザ光路が曲がったり、レーザ光束が広がってしまい、各キャピラリーを同一条件で照射することができなくなり、特に後側のキャピラリーに対しては十分な励起レーザ光強度が得られなくなる。そのため、このような場合キャピラリーを複数本並べることは困難になる。しかし、本実施例の構成の場合、キャピラリーを複数本並べてもそれぞれのキャピラリー内を泳動する試料をすべて同一条件でしかも高感度に検出することができることになる。そのため、多数の試料の同時計測を容易に達成することができる。

【0043】次に、本装置でDNAの塩基配列を決定する方法について説明する。周知のサンガー(Sanger)らのジデオキシ法により、蛍光標識したプライマーを使い、DNAポリメラーゼ反応を行って蛍光標識DNA断片を調製する。プライマーとして、FITCが結合したプライマー(標識プライマー)を使用する。まず、一本鎖DNAに標識プライマーを加え、アニール(2本鎖形成)して、一本鎖DNAに標識プライマーを結合させる。この反応液を4分割し、それぞれにA、C、G、Tに対応したDNAポリメラーゼ反応を行わせる。つまり、標識プライマーの結合した一本鎖DNAに4種のデオキシヌクレオチド三リン酸(dATP、dTTP、dCTP、dGTP)とターミネータとなるddATPを加えポリメラーゼ反応を行わせる。この反応により、末端がAの種々の長さの蛍光標識DNA断片を得る。同様の反応をC、G、Tについても行う。

【0044】上述のようにして得られる4つのA、C、G、Tの反応液を、それぞれ4つのキャピラリー27a~27dに導入する。導入法は第1の実施例と同様で、A反応液を27aに、C反応液を27bに、G反応液を27cに、T反応液を27dに導入する。導入後約10kVの電圧を印加することで電気泳動させる。波長488nmのアルゴンレーザ光を励起光として、各ギャップ29a~29dでの蛍光強度の時間変化を測定する。DNA断片は分子量の小さい順に泳動されることから、蛍光ピークの生じたギャップ位置を時間順に解析することで塩基配列が解析できる。

【0045】本実施例でも、第1の実施例と同様に検出される背景光強度が少なくなり、高感度に蛍光強度を検出することができる。しかも簡便な装置構成で複数の試料を同時に検出することができる。各塩基毎に蛍光体の種類を変えて、A、C、G、Tの各反応液を混合し、任意の1本のキャピラリーに注入し、各蛍光体の蛍光波長毎の蛍光強度の時間変化を複数のキャピラリーのそれぞれについて検出する装置構成とすれば、多数の試料のDNAの塩基配列を同時に計測することが可能になる。

【0046】〔実施例3〕上記第1の実施例及び第2の実施例では、蛍光測定により試料を検出する装置について説明したが、吸光度の測定、透過光強度の測定などの光吸収測定の場合も同様に装置を構成することができ

る。図4に、光吸収測定の場合の電気泳動装置の構成図を示す。泳動路として、内径100 μ m、外径200 μ m、長さ30cmのシリカ製のキャピラリー51及びそれと同じ内外径を有する長さ20cmのシリカ製のキャピラリー52の2本を使用する。キャピラリー51及び52には、変性剤の尿素を含む5%ポリアクリルアミドゲルを作成する。ゲルの作成方法は第1の実施例と同様であり、シランカップリング処理したキャピラリーにアクリルアミドゲルを化学的に結合させた。

【0047】このキャピラリー51及び52のそれぞれ10の一端を、第1の実施例と同様に光学セル54の内部に保持して試料の吸収に基づく透過光強度を測定する。光学セル54としては上下端が解放している4面透明の角形の光学セル（外形3mm角、内形1mm角）を使用し、第1の実施例の図2と同様の構成で、上記キャピラリー51及び52のそれぞれの一端を、光学セル54の内部に、同軸にかつ0.2mmのギャップ53を形成するように保持する。

【0048】ギャップ53空間を光学的検出部とする。20なお、キャピラリー51及びキャピラリー52のそれぞれ他端は、緩衝液（トリス、ほう酸、EDTAを含む緩衝液）を入れた陰極側電極槽5及び陽極側電極槽6に浸す。光学セル54の内部には緩衝液を注入してギャップ53を緩衝液で満たし、高電圧電源7により、陰極側電極槽5と陽極側電極槽6の間に直流高電圧を印加する。電圧印加により、キャピラリー52、ギャップ53、及びキャピラリー51内を電流が流れ、試料がキャピラリー51、ギャップ53、及びキャピラリー52と順に泳動する。

【0049】試料、例えばDNAの制限酵素切断断片の30導入は、陰極側のキャピラリー51の端を一時的に試料液に浸し、試料液と陽極側電極槽の間に5kVの電圧を10秒間程度印加することで行う。その後キャピラリーの端を元の陰極側電極槽に戻し、陰極側電極槽と陽極側電極槽の間に10kVの直流電圧を印加することで、試料は、キャピラリー51部で陰極側から陽極側に向かって分子量分離されつつ泳動され、ギャップ53を通過し、キャピラリー52に導かれる。

【0050】ギャップ53を通過するDNA断片に対して、キセノンランプやD₂ランプ等の光源55の光をモノクロメータ56を通し、レンズ57で集光し、ギャップ53を照射する。照射する光波長は試料の吸収波長に設定するのが通常であり、例えばDNA断片に対しては、260nm程度が適当である。DNA断片により光吸収を受け透過した光は、再びレンズ58で集光されて光電子増倍管59で検出される。光電子増倍管59からの出力信号は増幅器60で増幅され、コンピュータ等のデータ処理装置61で泳動パターン等処理され、それらの結果はモニタ62、プリンタ63に出力され、またメモリ64に保存される。

【0051】本実施例のように、緩衝液を満たしたギャップをキャピラリー間に設け、キャピラリー部を分子量分離部、ギャップ空間を吸光度を測定する光学的検出部と分けることで、照射光がキャピラリーで散乱されることがなく試料を効率よく照射することができ、高精度な吸光度測定が可能になる。具体的には、本実施例のようにギャップ部に光を入射させた時の透過光強度（試料が通過しない場合で受光用のレンズの開口数が0.19の場合）を1とすると、従来のようにキャピラリーを透過させる場合はその透過光強度が0.6程度に低下する。これはキャピラリー自体及び電気泳動で分子量分離させるための媒体であるポリアクリルアミドゲル等のゲルが光の散乱体であるため、その部分で入射光が散乱され、その結果透過光が減少するためである。透過光強度が低下することはその分だけ光検出器等のS/Nが低下することを意味し、測定精度が低下する。また、キャピラリーの表面等で散乱や反射した光もその一部が検出されてしまうが、これらの光は試料を照射することなく（試料による吸収を受けずに）直接検出器に入射する。このような試料の存在にかかわらずに検出される光成分があると、微小な光強度変化が測定しにくくなり、つまり精度の高い吸光度測定が困難になる。

【0052】本実施例では、光はギャップ空間を通過する、つまり光散乱の極めて少ない緩衝液中を透過するため、上記のようなキャピラリー自体及びゲル等による光散乱の影響を受けることがなくなる。そのため、試料が効率よく照射され、高精度な吸光度測定が可能になる。なお、本実施例では、モノクロメータ56を通した光を、レンズによりギャップ部に集光して照射している30が、集光せずにほぼ平行光として照射し、ギャップ部を通過した光のみを空間的に分離してその光強度を測定することでも同様に測定が可能である。

【0053】また、第2の実施例のように複数のキャピラリー対を設け、同時に複数の試料の吸収を計測することも可能である。この場合、光の照射軸に対して垂直な面内に複数のキャピラリー対を配置し、複数のギャップの個々の透過光強度を2次元センサ等で検出する装置構成とすればよい。

〔実施例4〕上記第1から第3の実施例では、キャピラリー対によりギャップを形成したが、ギャップはキャピラリー対のみによって形成されるものではない。例えば、分子量分離部を上記実施例と同じくキャピラリーとし、このキャピラリー端と細孔を有した平板とでギャップを形成することもできる。

【0054】図5にキャピラリーと細孔を有した平板とでギャップを形成した蛍光セル部の拡大断面図を示す。第1の実施例と同様にポリアクリルアミドゲルを充填したキャピラリー71と細孔72を有する平板73（例えば四ふつ化エチレン樹脂製の平板）を、キャピラリー71の軸と細孔72の軸がほぼ一致するように対向させて50

15

配置し、ギャップ74を形成させる。これらを蛍光セル75の内部に保持する。蛍光セルは、上下端が開放している例えば外形3mm角、内形1mm角の角形の蛍光セルであり、上部から例えば四ふつ化エチレン樹脂製のブロック76で押さえ、また下部からは平板73で押さえ固定され、セル内に緩衝液などを保持できるようにする。四ふつ化エチレン樹脂製ブロック76にはキャピラリー71の外形に一致する孔が設けられており、その孔にキャピラリー71を通してキャピラリー71を保持し、また、ギャップ74の長さが0.1mmから1mmとなるように調整できるようにする。キャピラリー71の他端は第1の実施例と同様に陰極側電極槽に浸される。また平板73の下部には、チューブ固定具78により四ふつ化エチレン樹脂製チューブ77を接続し、陽極側電極槽に導かれる。なお、直接平板73を陽極側電極槽に接触させてもよい。

【0055】なお、図5では図示していないが図2と同様に蛍光セル75の内部に緩衝液等を注入するための注入口が設けられており、泳動時にはバルブなどを介して緩衝液を注入して蛍光セル75の内部及びギャップ74空間及び四ふつ化エチレン樹脂製チューブ77を満たし、緩衝液の注入を止めた後、試料を電気泳動させる。本実施例によれば、第1の実施例と同様に背景光強度の少ない蛍光検出ができ、試料の高感度蛍光検出が可能になる。

【0056】また、平板73に複数の細孔を一直線上に配置すれば、第2の実施例と同様の効果を有する蛍光セル部を構成することもできる。また、本実施例によれば、一方が平板73であるため、装置の組立てが容易になる。

【0057】

【発明の効果】本発明によれば、光学測定をキャピラリーゲル等の分子量分離部の外で行うことにより、背景光等の影響の少ない高感度な蛍光または光吸収計測が可能な電気泳動装置が実現できる。また、ゲル電気泳動での分子量分離性能を損なうことなく、電解液からなる蛍光または光吸収測定部を簡便に構成でき、容易に装置化できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の第1の実施例の電気泳動装置の構成図。

16

【図2】 本発明の第1の実施例の蛍光セル部の拡大断面図。

【図3】 本発明の第2の実施例の電気泳動装置の蛍光検出部の構成図。

【図4】 本発明の第3の実施例の電気泳動装置の構成図。

【図5】 本発明の第4の実施例の蛍光セル部の拡大断面図。

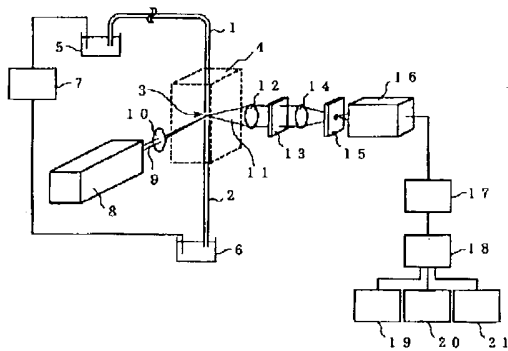
【図6】 従来例のキャピラリーを使った電気泳動装置の蛍光測定部の構成図。

【図7】 従来例のキャピラリーを使った電気泳動装置のシースフローキューベットを使用した蛍光測定部の構成図。

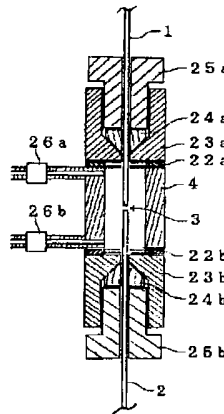
【符号の説明】

1…キャピラリー、2…キャピラリー、3…ギャップ、4…蛍光セル、5…陰極側電極槽、6…陽極側電極槽、7…高電圧電源、8…アルゴンレーザ光源、9…レーザ光、10…レンズ、11…蛍光、12…レンズ、13…干渉フィルタ、14…レンズ、15…スリット、16…光電子増倍管、17…増幅器、18…データ処理装置、19…モニタ、20…プリンタ、21…メモリ、22a及び22b…シリコーンゴムパッキン、23a及び23b…キャピラリー保持具、24a及び24b…フェラル、25a及び25b…押しネジ、26a及び26b…バルブ、27a、27b、27c及び27d…キャピラリー、28a、28b、28c及び28d…キャピラリー、29a、29b、29c及び29d…ギャップ、30…蛍光セル、31…レーザ光源、32…レーザ光、33…レンズ、34…レンズ、35…干渉フィルタ、36…レンズ、37…ラインセンサ、38…データ処理装置、39…モニタ、40…プリンタ、41…メモリ、42及び43…キャピラリー保持具、44…蛍光、51…キャピラリー、52…キャピラリー、53…ギャップ、54…光学セル、55…光源、56…モノクロメータ、57…レンズ、58…レンズ、59…光電子増倍管、60…増幅器、61…データ処理装置、62…モニタ、63…プリンタ、64…メモリ、71…キャピラリー、72…細孔、73…平板、74…ギャップ、75…蛍光セル、76…四ふつ化エチレン樹脂製のブロック、77…四ふつ化エチレン樹脂製チューブ、78…チューブ固定具。

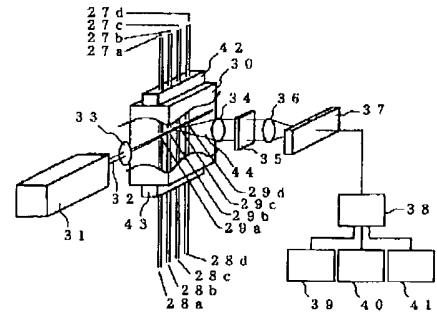
【図1】



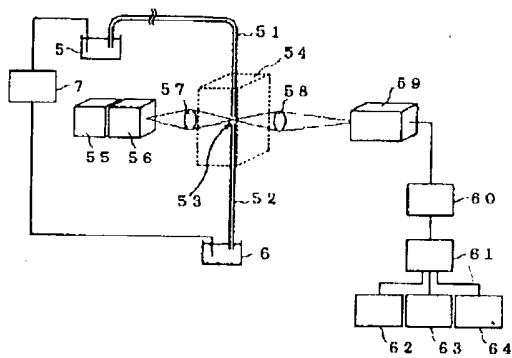
【図2】



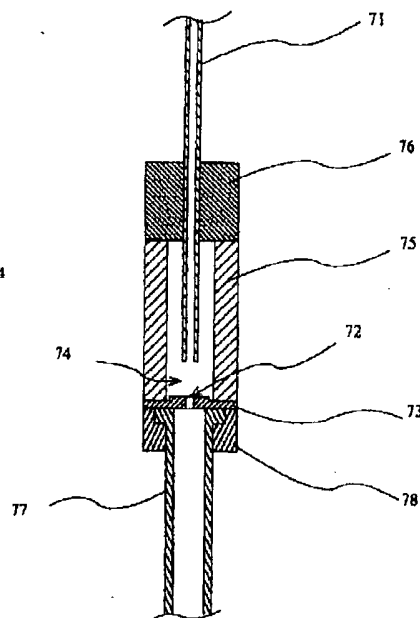
【図3】



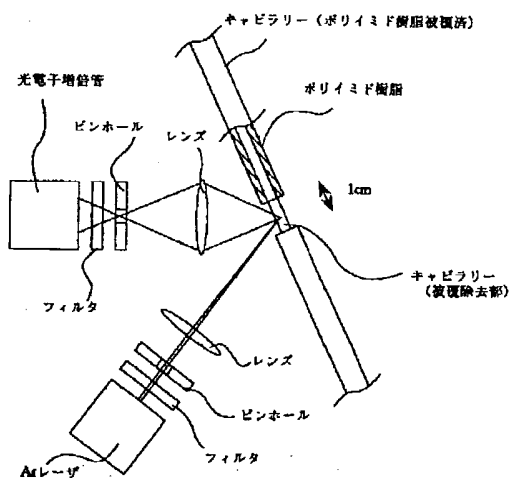
【図4】



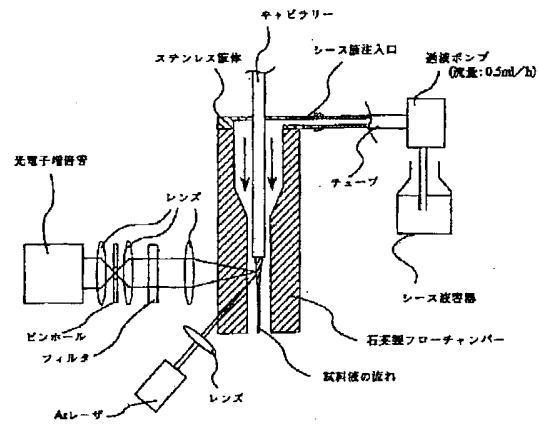
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁵

// C12M 1/00

C12Q 1/68

識別記号 序内整理番号

A

A 8114-4B

F I

技術表示箇所

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The migration way which penetrates an optical cel is formed between the cathode electrode tub to which direct current voltage was impressed according to the power source, and an anode plate electrode tub. It is the electrophoresis apparatus with which the upstream migration way of said optical cel is specified by the capillary tube at least. Termination is carried out into the optical cel with which the inside dimension of the direction which intersects the end of said capillary tube perpendicularly with said migration way filled the electrolytic solution inside more greatly than the path of said migration way. The electrophoresis apparatus characterized by using the migration way besides said capillary tube in said optical cel as an optical detecting element, carrying out an optical exposure from the light source at this optical detecting element, and detecting a sample.

[Claim 2] The electrophoresis apparatus according to claim 1 characterized by constituting the sample separation section of said electrophoresis way from capillary tube gel.

[Claim 3] The electrophoresis apparatus according to claim 1 or 2 characterized by making the shaft mostly in agreement [the other end of the capillary tube of the pair connected to said cathode electrode tub or the anode plate electrode tub, respectively] in said cel, for an end forming a fixed gap, making it counter, arranging, and using this gap as said optical detecting element.

[Claim 4] The electrophoresis apparatus according to claim 3 characterized by said gap length being 1mm or less.

[Claim 5] The electrophoresis apparatus according to claim 3 or 4 characterized by having arranged two or more optical detecting elements formed of two or more capillary tube pairs in a single optical cel, and said two or more optical detecting elements having connected through the electrolytic solution mutually.

[Claim 6] Said optical detecting element is an electrophoresis apparatus given in any 1 term of claims 1-5 characterized by being what detects the fluorescence emitted from a sample.

[Claim 7] Said optical detecting element is an electrophoresis apparatus given in any 1 term of claims 1-5 characterized by being what measures the light absorption by the sample.

[Claim 8] The electrophoresis apparatus according to claim 5 characterized by detecting to coincidence the fluorescence emitted from the sample which aligned, has arranged said two or more capillary tube pairs so that two or more optical detecting elements formed of two or more capillary tube pairs may be located on a straight line, irradiated a single excitation light along with said straight line so that all optical detecting elements might be irradiated at coincidence, and was injected into each capillary tube.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the suitable electrophoresis apparatus especially for detection of DNA (nucleic acid) etc. about the electrophoresis apparatus which carries out separation analysis of a nucleic acid, protein, the sugar, etc.

[0002]

[Description of the Prior Art] Molecular weight separation of the sample by which fluorescent labeling was carried out is carried out by electrophoresis, and there is base-sequence-determination equipment of DNA which used the fluorescent substance as the indicator object, for example as an electrophoresis apparatus to analyze. The base-sequence-determination approach is based on the dideoxy chain termination method of well-known Sanger and others (Sanger). That is, DNA to analyze is introduced into a vector, is amplified, is denatured, and the template DNA of a single strand is built. Primer DNA is combined with this template DNA, and the complementary strand composition on the basis of primer DNA is made to perform. Under the present circumstances, one sort of specific dideoxy nucleotide triphosphoric acid used as the terminator other than four sorts of deoxy nucleotide triphosphoric acid is added. Since complementary strand composition stops when this dideoxy nucleotide triphosphoric acid is incorporated, the DNA fragment of various die length which stopped at the specific base is obtained. Then, ddCTP, the dideoxy nucleotide triphosphoric acid, i.e., ddATP, to an adenine (A), a cytosine (C), a guanine (G), and four sorts of bases of a thymine (T), ddGTP, and ddTTP are used, the DNA fragment of the various die length whose end bases are A, C, G, and T, respectively is obtained by making the above-mentioned complementary strand composition reaction perform, respectively, molecular weight separation of these is carried out, and a base sequence can be analyzed by reading a base kind in order of molecular weight. Molecular weight separation is performed by the electrophoresis using polyacrylamide gel.

[0003] The automated equipment based on this approach mainly automates the electrophoresis section and the analysis section. for example, with "Nature", the 321st volume, and the equipment indicated by the 674-679th page (Nature, 321, 674-679 (1986)) (1986) four sorts per class of end base of a DNA fragment of different fluorescent substances (a fluorescein --) 4-chloro-7-nitrobenzo-2-OKISA-1-diazole (NBD), A base sequence is determined by carrying out an indicator in a tetramethyl rhodamine and the Texas red (Morecular probe company product), exciting the fragment which migrates as a migration way and migrates the glass tube whose bore is 1-2mm in order of molecular weight by the laser beam, and carrying out fluorescence detection. The maximum fluorescence wavelength of four sorts of fluorescent substances is 520nm, 550nm, 578nm, and near 605nm, and four sorts of bandpass interference filters which make each wavelength region penetrate have separated and detected each fluorescence (the 1st conventional example). Moreover, there is an approach which a bore creates gel to a capillary tube 100 micrometers or less, and makes the electrophoresis section. For example, by the approach of a "new KUREIKKU acid research" magazine, the 18th volume, and a page [1415-1419th] (Nucleic Acid Research, 18, 1415-1419 (1990)) (1990) publication, as shown in drawing 6 , a capillary tube with a bore of 75 micrometers is used and the high speed and high separation detection of a DNA fragment etc. are aimed at by impressing the high voltage of 9kV. The shaft of a capillary tube and the exposure shaft of a laser beam are made to incline about 25 degrees from a perpendicular direction, and the detecting element of this approach condensed the laser beam in diameter of about 20 micrometers in the core of a capillary tube, with the bandpass interference filter etc., it carried out the spectrum of the fluorescence irradiated and produced, and has detected it (the 2nd conventional example). In addition, drawing 6 changes intelligibly equipment given [above-mentioned] in the conventional example.

[0004] Furthermore, the method of determining the base sequence of DNA also as a "journal OBU chromatography" magazine, the 516th volume, and the 61-67th page (Journal of Chromatography, 516, 61-67 (1990)) (1990) with capillary tube gel electrophoresis is indicated. By this approach, the bore is carrying out molecular weight separation of

the DNA fragment using the capillary tube which is 50 micrometers. The measuring device in this example is fundamentally indicated by "Science", the 242nd volume, and the 562-564th page (Science, 242, 562-564 (1988)) (1988). The equipment configuration which added and edited the laser light source, the pump for sheath flows, etc. into equipment given in "Science" in order to make it intelligible was shown in drawing 7. detection of a DNA fragment leads the supernatant liquid by which molecular-weight separation was carried out to the flow chamber made from a quartz (inner form 250micrometerx 250 micrometers), and carries out a flow with a pump by using the buffer solution as sheath liquid -- making -- a sheath flow condition -- carrying out -- the supernatant liquid of a flow chamber which flows a core mostly -- receiving -- a laser beam -- the diameter of about 10 micrometers -- condensing -- irradiating -- a spectrum -- the fluorescence from a DNA fragment is detected through a filter etc. (the 3rd conventional example).

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] In the electrophoresis apparatus, high sensitivity-ization of detection is desired with minute-amount-izing of a sample etc. Generally, in the fluorometry in an electrophoresis condition, the scattered light in the wall and outer wall of the base material, for example, a capillary tube, of the scattered lights (Rayleigh scattering etc.) of the excitation light by gel and fluorescence, and gel or the fluorescence from the capillary tube itself arises as a background light besides the fluorescence from the fluorescent substance itself made into the purpose. Therefore, background level becomes high and the fall of detection sensitivity will be caused. That is, in order to attain high sensitivity fluorescence detection, it becomes an important technical problem how such a background light is removed.

[0006] In the conventional example of the above 1st, the bandpass interference filter has separated excitation light (scattered light) and fluorescence. However, it is difficult to separate the property top scattered light of an interference filter completely. Moreover, it is difficult for fluorescence to arise from gel and the glass tube itself, though feeble, and to fully remove background light only with spectra, such as a bandpass interference filter.

[0007] carrying out a spectrum and carrying out fluorescence detection with a bandpass interference filter etc., in the 2nd conventional example, -- in addition, the rate of the scattered light from the capillary tube condensed with a lens is lessened by making the shaft of a capillary tube incline from a perpendicular about 25 degrees to a flat surface including the exposure shaft and the fluorescence condensing shaft of a laser beam. However, it cannot be said that removal of background light is enough. For example, the cross section is a circle and a capillary tube is a configuration on which excitation light tends to be scattered. Moreover, since the diameter of a capillary tube is small, the capillary tube wall and outer wall which the scattered light generates, and the location which the fluorescence from a sample generates approach very much, and it becomes difficult to separate both spatially. Furthermore, the scattered light and the fluorescence by gel are unremovable by the above-mentioned approach. Moreover, since excitation light is aslant irradiated to the sample condensed in the migration direction, there is also a problem that separability tends to worsen.

[0008] In the 3rd conventional example, by using a capillary tube gel edge as the sample inlet of a sheath flow chamber, in order to make a sample solution draw out of capillary tube gel and to perform fluorometry under a sheath flow, generating of the scattered light from gel and fluorescence is lost in the scattered-light list in a capillary tube interface. Moreover, in a sheath flow chamber, since [the] a core is mostly flowed in the state of a laminar flow and the wall of a flow chamber is not contacted, a sample solution can separate spatially the scattered light from a flow chamber, and the fluorescence from a sample, and can detect fluorescence intensity to high sensitivity. However, in order to form a sheath flow, it is necessary to always carry out a flow with constant flow into a sheath flow chamber with the pump for liquid chromatography etc. by using the buffer solution as sheath liquid. Therefore, it is expensive in equipment and there are problems, such as becoming complicated.

[0009] The purpose of this invention solves the trouble of the above-mentioned conventional technique, and is to offer the electrophoresis apparatus which can perform the fluorometry of a sample or light absorption measurement separated by electrophoresis simple by high sensitivity.

[0010]

[Means for Solving the Problem] In order to attain the above-mentioned purpose, this invention carries out molecular weight separation of the samples, such as a nucleic-acid fragment by which the indicator was carried out with the fluorescent substance, by electrophoresis, and in the electrophoresis apparatus which detects optically said sample by which molecular weight separation was carried out, and analyzes a sample, the equipment which constitutes an electrophoresis way from the molecular weight separation section filled up with gel and an optical detecting element filled with the electrolytic solution is offered.

[0011] As for the above-mentioned molecular weight separation section, constituting from capillary tube gel is desirable. Moreover, the optical detecting element filled with the electrolytic solution can be formed by maintaining a fixed gap at the shaft orientations of a capillary tube, and making close to them the capillary tube edge which the shaft is made mostly in agreement, arranges two capillary tubes linearly, and carries out phase opposite. In this case, in while

it is located in the upstream of an electrophoresis way at least, a capillary tube serves as the molecular weight separation section, and the space section of a gap turns into an optical detecting element. In this optical detecting element, the fluorescence by the sample or light absorption is measured.

[0012] Moreover, the gap length is constituted so that it may be set to 1mm or less. In addition, as for a gap, it is desirable to hold inside the optical cel which has bigger inside dimension than the path of an electrophoresis way. Moreover, two or more optical detecting elements formed of two or more capillary tube pairs can also constitute so that it may be mutually connected through the electrolytic solution.

[0013] Furthermore, by arranging two or more optical detecting elements by two or more capillary tubes in one train, irradiating a single excitation light in this direction of a train, and irradiating two or more above-mentioned optical detecting elements at coincidence, it can also constitute so that fluorometry may be performed to coincidence by two or more above-mentioned optical detecting elements.

[0014]

[Function] In the electrophoresis apparatus which carries out molecular weight separation of the samples, such as a nucleic-acid fragment by which the indicator was carried out with the fluorescent substance, by electrophoresis, detects optically said sample by which molecular weight separation was carried out, and analyzes a sample By constituting an electrophoresis way from the molecular weight separation section filled up with gel, and an optical detecting element filled with the electrolytic solution of the gel exterior, and performing the fluorescence of a sample, or light absorption measurement in the electrolytic solution without gel Generating of the scattered light from gel base materials, such as a capillary tube, and fluorescence can be avoided in the scattered light by gel and fluorescence, and a list, and high sensitivity fluorescence or light absorption detection is attained. And there is no need of carrying out the flow of the electrolytic solution mechanically, and it becomes a simple equipment configuration. In addition, molecular weight separation by electrophoresis can be performed as usual by preparing the molecular weight separation section which consists of gel.

[0015] In addition, high-speed separation is attained by constituting the molecular weight separation section from capillary tube gel. Moreover, the molecular weight separation section and an optical detecting element can be constituted simple by maintaining a fixed gap at the shaft orientations of a capillary tube, and making close to them the capillary tube edge which the shaft is made mostly in agreement, arranges two capillary tubes linearly, and carries out phase opposite. In this case, the above-mentioned gap space serves as an optical detecting element which measures the fluorescence or light absorption of a sample, electrophoresis becomes possible by filling the electrolytic solution to this gap space, and background light, such as the scattered light from gel and a capillary tube, can be removed. Moreover, the molecular weight separation section can consist of easily creating gel to one [at least] capillary tube.

[0016] As for gap length, it is desirable to be referred to as 0.1 to 1mm. Since a sample becomes easy to migrate gap space the more the more it generally shortens gap length, gap length's shorter one is fundamentally desirable. However, since the adjustment will become difficult if gap length is too short when assembling equipment, 0.1mm or more is usually actually desirable. However, it is also possible to set it as 0.1mm or less, and the limitation is determined by the width of face of the excitation flux of lights, such as a laser beam in the gap section. When gap length is lengthened, a sample diffuses the gap section and stops moreover, migrating to the capillary tube of another side etc. conversely, without migrating gap space linearly. When gap length was about 2-3mm, it checked that a sample could migrate normally, but since it stops migrating normally depending on conditions, such as a migration electrical potential difference, gap length's about 1mm or less is desirable in practice. That is, electrophoresis of the sample can be efficiently carried out simple by setting gap length to 0.1 to 1mm.

[0017] The capillary tube edge which forms a gap Moreover, bigger inside dimension than the path of an electrophoresis way, For example, by holding inside the optical cel which has the bigger optical path length than the outer diameter and optical-path width of face of a capillary tube, filling the interior with the electrolytic solution, and carrying out electrophoresis of the sample Since a sample migrates the line top which connects a capillary tube and a capillary tube and does not contact an optical cel inside, it can remove the adsorption to a cel inside, and the effect of the scattered light from a cel inside, and can raise detection sensitivity.

[0018] Moreover, it becomes possible to detect two or more samples on the same conditions mostly to coincidence by holding two or more optical detecting elements formed of two or more gap space of each of a capillary tube pair inside one optical cel, and making each other connect through the electrolytic solution. Furthermore, it enables it to be formed in seriate, and for the optical detecting element which measures the fluorescence emitted from a sample to irradiate coincidence, and to carry out fluorometry of two or more optical detecting elements to coincidence by single excitation light, by arranging two or more capillary tube pairs in one train. Furthermore, by making two or more optical detecting elements of each other connect through the electrolytic solution, excitation light can be efficiently led to each optical detecting element through the electrolytic solution with little light scattering, and fluorescence can be detected with

high precision.

[0019]

[Example] Hereafter, an example explains this invention to a detail more.

[Example 1] In this example, molecular weight separation of the DNA fragment which carried out fluorescent labeling is carried out by electrophoresis, and fluorescence detects. The case where a fluorescein isothiocyanate (FITC) is used is explained as a fluorescent substance for indicators.

[0020] The block diagram of the electrophoresis apparatus of this example is shown in drawing 1. Two of the capillary tube 2 with a die length of 5cm made from a silica have the capillary tube 1 with the bore of 100 micrometers, an outer diameter [of 375 micrometers], and a die length of 30cm made from a silica and the same diameter of inside and outside as it are used. In a capillary tube 1, 5% polyacrylamide gel containing the urea of a modifier is created. First, the interior of a capillary tube is washed and silane coupling processing is carried out. Subsequently, tetramethylethylenediamine and a persulfuric acid ammonium solution are added to 4.75% of deaerated acrylamide, 0.25% of bis-acrylamide, the urea of 7M, the tris containing EDTA of 2mM, and the way acid buffer solution, a polymerization is poured in and carried out to a capillary tube, and acrylamide gel is created. Since silane coupling processing of the capillary tube is carried out, acrylamide gel and a capillary tube are combined chemically and gel does not have ***** from a capillary tube at **** at the time of migration.

[0021] Moreover, a capillary tube 2 is adjusted so that the inside may have positive charge. First, 3-(2-aminoethyl aminopropyl) trimethoxysilane solution is made to pour in and react to a capillary tube, it heat-treats at 110 degrees C, amino silanizing of the capillary tube inside is carried out, and it is made to have positive charge. The sense of the electroendosmose style of the capillary tube 2 interior turns into sense of a positive electrode from a negative electrode by doing in this way, the migration direction (negative electrode -> positive electrode) of the sample in the capillary tube 1 filled up with acrylamide gel and the migration direction (negative electrode -> positive electrode) of the sample in a capillary tube 2 are in agreement, and the migration of a sample becomes easy.

[0022] Opposite maintenance of each end of these capillary tubes 1 and 2 is carried out inside an optical cel, and a sample is detected optically. Here, in order for fluorescence to detect a sample, a fluorescence cel is used as an optical cel. that is, each end of the above-mentioned capillary tubes 1 and 2 -- the fluorescence cel 4 made from a quartz (3mm angle of appearances, 1mm angle of inner forms) interior of a square shape -- the same axle -- and form the gap 3 of 0.1mm, it is made to counter, and it holds, and let gap space be an optical detecting element. In addition, each other end of a capillary tube 1 and a capillary tube 2 is dipped in the cathode lateral electrode tub 5 and the anode plate lateral electrode tub 6 which put in the buffer solution (tris, a way acid, buffer solution containing EDTA). Moreover, the buffer solution containing a glycerol is poured into the fluorescence cel 4 made from a quartz interior, a gap 3 is filled with the buffer solution, and the direct-current high voltage is impressed according to the high-voltage power source 7 between the cathode lateral electrode tub 5 and the anode plate lateral electrode tub 6.

[0023] By electrical-potential-difference impression, a current flows the inside of a capillary tube 2, a gap 3, and a capillary tube 1. The die length of a gap 3 is short and a current flows centering on the line top which tied the shaft of a capillary tube 2 and a capillary tube 1 with the gap 3. Therefore, it will pass without the sample by which electrophoresis is carried out also flowing out of a capillary tube 1, and diffusing the inside of a gap 3 not much, and will flow into a capillary tube 2. That is, a sample will migrate, without contacting the inside of the fluorescence cel 4. In addition, although the buffer solution containing a glycerol was poured into the fluorescence cel 4 interior 3, i.e., a gap, addition of a glycerol aims at reduction of the effect of the convection current by the viscosity of the buffer solution increasing, and improvement in the field strength in a gap 3. Diffusion within the gap 3 of a sample can be suppressed and a sample can be made to migrate from a capillary tube 1 certainly easily to a capillary tube 2 by suppressing the convection current of the buffer solution and raising field strength now.

[0024] Although the glycerol was used in this example for the above-mentioned purpose, if viscosity is the matter which can be highly used for electrophoresis, it can be used similarly. For example, a polyethylene glycol, shoe cloth, etc. can be used. In addition, if a gap 3 is narrow, the usual buffer solution which does not contain a glycerol etc. is also usable enough. Installation of the fluorescent-labeling DNA fragment which is a sample dips temporarily the edge of the capillary tube 1 by the side of cathode in a sample solution, and performs the electrical potential difference of 5kV by carrying out grade impression for 20 seconds between a sample solution and the anode plate lateral electrode tub 6. If the edge of a capillary tube 1 is returned to the original cathode lateral electrode tub 5 after that and the direct current voltage of 10kV is impressed between the cathode lateral electrode tub 5 and the anode plate lateral electrode tub 6, a sample will migrate molecular weight separation being carried out toward an anode plate side from a cathode side within a capillary tube 1, and will pass a gap 3.

[0025] To the DNA fragment which passes a gap 3, the laser beam 9 with a wavelength [of the argon laser light source 8] of 488nm is extracted to about 20 micrometers with a lens 10, and is irradiated. It is condensed with a lens 12 from

the laser beam direction of radiation and a perpendicular direction, the fluorescence 11 emitted from the DNA fragment is removed by the interference filter 13 in background light, such as the scattered light, and image formation is carried out to a slit 15 with a lens 14. A photo-multiplier 16 detects the light which passes a slit 15, it amplifies with an amplifier 17, a migration pattern etc. is processed with the data processors 18, such as a computer, and those results are outputted to a monitor 19 and a printer 20, and it saves in memory 21.

[0026] As an interference filter 13, in order to detect the fluorescence from FITC effectively, the bandpass interference filter which passes through a 500nm - 540nm wavelength region is used. Moreover, lens systems 12 and 14 are constituted so that an image scale factor may become actual size. And it is set as 50 micrometers in the migration direction, and opening of a slit 15 is set to 100 micrometers at the laser beam direction of radiation, and it adjusts so that the fluorescence image in a gap 3 may come to the core of opening. In order that a sample may migrate only near the gap 3, it is constituting optical system in this way, and image formation of the scattered light in the fluorescence cel 4 made from a quartz section of a laser beam is not carried out to opening of a slit 15, but it is no longer detected by the photomultiplier tube 16. Moreover, since a capillary tube and the scattered light from gel, and fluorescence are not generated, either, background light reinforcement decreases sharply.

[0027] Drawing 2 is the expanded sectional view of the fluorescence cel section. The fluorescence cel 4 made from a quartz is pressed down and fixed with the capillary tube holders 23a and 23b. Moreover, it considers as the structure which prevents a liquid spill by inserting the silicone rubber packing 22a and 22b between the fluorescence cel 4 and Holders 23a and 23b. Capillary tubes 1 are FERARU 24a made of a polytetrafluoroethylene, and push screw 25a, and are fixed to capillary tube holder 23a. A capillary tube 2 is similarly fixed by FERARU 24b and push screw 25b. Spacing of a capillary tube 1 and a capillary tube 2 can be freely adjusted by specifying the die length from FERARU of a capillary tube, and is set to 0.1mm as mentioned above by this example. In addition, the inlet for pouring in the buffer solution etc. independently is established in the fluorescence cel section, and Bulbs 26a and 26b are connected to it. After this fixes a capillary tube, it is used for filling the buffer solution in the fluorescence cel 4. In addition, inlets, such as the buffer solution, can also be established in the part of the holder of a fluorescence cel.

[0028] Fluorescent-labeling DNA fragment measurement is tried with the equipment of this example. A fluorescent-labeling DNA fragment is prepared by using the primer which carried out fluorescent labeling and performing a DNA polymerase reaction with the dideoxy chain termination method of well-known Sanger and others (Sanger). As a primer, the primer (indicator primer) which the fluorescein isothiocyanate (FITC) combined is used. First, an indicator primer is added and annealed to a single stranded DNA, and an indicator primer is combined with a single stranded DNA. Next, dATP, dTTP, dCTP, dGTP, and ddATP are added, and a DNA polymerase reaction is made to perform. By the above actuation, an end obtains the fluorescent-labeling DNA fragment of the various die length of A.

[0029] A sample can be introduced into a capillary tube as mentioned above, and the molecular weight separation pattern of a DNA fragment can be measured by measuring the fluorescence intensity in gap space. And when carrying out fluorescence detection, without making a gap form like the conventional example of drawing 6, the capillary tube of the same configuration with a die length of 35cm is used, the protective coat of the capillary tube whose migration distance is 30cm is stripped, compared with the case where fluorescence detection is carried out in this part, by this example, the background light reinforcement detected turns into about [1/10 or less], and a lower-concentration sample can be detected.

[0030] According to this example, a sample can be detected to high sensitivity, without spoiling a molecular weight separation property using gel. And without carrying out the flow of the buffer solution using a pump etc., a sample can be made to be able to migrate only into the specific part in the fluorescence cel for fluorescence detection, and equipment can be constituted simple. In addition, the laser equipment and the fluorescent substance to be used are not restricted to argon laser and FITC, and the fluorescent substance and the suitable laser equipment of arbitration can be used for them. Moreover, it is possible one sort of not only fluorescent substances but to detect the fluorescence from two or more sorts of fluorescent substances to coincidence. In that case, only the number which is in agreement with the number of fluorescent substances prepares the group of the photodetection equipment which consists of a lens 12, an interference filter 13, a lens 14, a slit 15, and the photomultiplier tube 16, for example in drawing 1, and each should just detect the fluorescence of a separate wavelength region. Or it is possible also by leading fluorescence to a spectroscope and receiving light with a line sensor.

[0031] The base sequence of DNA can also be determined by applying this equipment. That is, after using the primer which carried out the indicator with a different fluorescent substance for every class of end base and making a DNA polymerase reaction perform, respectively, electrophoresis of the reaction mixture is mixed and carried out. And the fluorescence of the DNA fragment which passes through gap space can be detected, a base kind can be identified by identifying the class of fluorescent substance at that time, and a base sequence can be determined. In addition, what is necessary is just to carry out forming 4 sets of photodetection equipments which detect four sorts of fluorescence

- wavelength regions as mentioned above in drawing 1 etc., in order to identify the class of fluorescent substance.
- [0032] In addition, although measurement of a DNA fragment was made into the example and this example explained, it can be used also for analysis of protein, sugar, etc. with a natural thing. Moreover, although the capillary tube of the bore with two [same] was used in this example, the combination of the capillary tube of a different bore is also possible. For example, since it will be extracted when the sample which migrates from capillary tube 1 edge is introduced into a capillary tube 2 if the bore of a capillary tube 2 is made thinner than the bore of a capillary tube 1, the concentration of a sample solution becomes high and it can detect to high sensitivity more. Moreover, if the bore of a capillary tube 2 is made thicker than the bore of a capillary tube 1, the sample which migrates from capillary tube 1 edge can be made to introduce into a capillary tube 2 more easily and certainly.
- [0033] Furthermore, according to this example, since the fluorescence from a sample can be measured without making the capillary tube section penetrate excitation light, a capillary tube does not need to be transparent. That is, since it is not necessary to remove covering of a capillary tube, handling becomes easy. It also becomes possible to use capillary tubes of the various quality of the materials, such as a capillary tube made of a fluororesin with still more opaque polytetrafluoroethylene, 3 ****-ized ethylene chloride resin, etc. Since the capillary tube made of a fluororesin has little adsorption of a sample, processing actuation of surface treatment etc. is unnecessary for it, and since there is no breakage, its operability improves. Moreover, since it excels in chemical resistance, it becomes possible to use the solvent of broad pH range.
- [0034] [Example 2] Next, four capillary tubes are put in order and the equipment which carries out fluorescence detection is explained to coincidence. Drawing 3 is the block diagram of the fluorescence detecting element of the electrophoresis apparatus of this example. It is 27a, 27b, 27c, and a capillary tube with the bore of 100 micrometers, an outer diameter [of 375 micrometers], and a die length of 30cm made from a silica, and 27d of ends is dipped in the cathode lateral electrode tub like drawing 1 (it is omitting). Moreover, similarly, it is a capillary tube with a die length of 5cm which has the same diameter of inside and outside as the above made from a silica, and the end is dipped in the anode plate lateral electrode tub 28a, 28b, 28c, and 28d.
- [0035] 5% polyacrylamide gel which contains the urea of a modifier in these capillary tubes by the same technique as the 1st example is created. Moreover, silane coupling processing is performed to each capillary tube, and acrylamide gel and a capillary tube are combined chemically, and at the time of migration, from a capillary tube, it considers so that gel may not be ****. The gaps 29a-29d of fixed spacing are held to the interior of the fluorescence cel 30 made from a quartz of a square shape like the 1st example, it is fixed to it, and this capillary tube (27a-27d) and a capillary tube (28a-28d) form two or more optical detecting elements.
- [0036] Immobilization of a capillary tube uses for the block made of a fluororesin, for example, a polytetrafluoroethylene, the capillary tube holders 42 and 43 which prepared four perpendicular holes at intervals of 1mm on the straight line. It adjusts so that it may insert one capillary tube in four perpendicular holes at a time, and may be made for 28c, 27d, and 28d to be set to 27a, 28a and 27b, and 28b and 27c on the same axle, respectively and with a gaps [29a-29d] die length may be set to 0.2mm, respectively.
- [0037] At the time of fluorometry, the buffer solution containing a glycerol is poured into the fluorescence cel 30 made from a quartz interior, and gaps 29a-29d are filled with the buffer solution. If an electrical potential difference is impressed in this condition, the sample introduced into capillary tube 27a migrates next to gap 29a to capillary tube 28a. The sample introduced into other capillary tubes migrates similarly. In addition, the glycerol in the buffer solution suppresses the convection current of the buffer solution of the gap section like the 1st example, and it is used in order to make a sample migrate from capillary tubes 27a-27d certainly and easily to capillary tubes 28a-28d.
- [0038] Fluorescence detection of the DNA fragment which passes gaps 29a-29d is performed as follows. First, the laser beam 32 from the laser light source 31 for fluorescent substance excitation is extracted with a lens 33, and it is made to irradiate at coincidence, two or more optical detecting elements 29a-29d, i.e., gaps. A focal location is set up in the middle of gaps 29b and 29c, and it is adjusted so that exposure spot size may serve as 100 micrometers of diameters at the maximum equator among gaps 29a-29d. for example, the thing for which the lens whose focal distance is about 150mm as a lens 33 is used -- a gap 29 -- a-29d can be irradiated with the almost same spot size.
- [0039] The fluorescence 44 emitted from the DNA fragment which passes each gap condenses with a lens 34 from a direction perpendicular to the laser beam direction of radiation, removes background light, such as the scattered light, with an interference filter 35, condenses with a lens 36, and carries out image formation to the 37th page of line sensors, such as a CCD camera and a photo diode array. From the output of a line sensor 37, the data processors 38, such as a computer, perform data processing, such as a migration pattern, and those results are outputted to a monitor 39 and a printer 40. Moreover, data are saved in memory 41.
- [0040] Argon laser light with a wavelength of 488nm is used as a laser beam, an FITC solution is used as a sample, and the inside of each capillary tube 27a-27d is made to migrate continuously. If a line sensor 37 detects the fluorescence

image of the sample which migrates the gap space which is an optical detecting element, in the optical detecting element corresponding to with a gaps [29a-29d] four places, i.e., each migration way, strong fluorescence will be mutually detected independently with other optical detecting elements. By measuring the signal strength of the part corresponding to each migration way on a line sensor, the sample which migrates each capillary tube is further detectable to coincidence continuously.

[0041] It becomes analyzable covering many items, such as analysis of the side chain or functional group which could detect the fluorescence from the sample which migrates on the same conditions being simultaneous and mostly in two or more optical detecting elements, for example, used the base sequence determination of DNA, the base sequence coincidence decision of the many samples DNA, and a fluorescent substance by this example, and detailed analysis of the sample separated with liquid chromatography. Moreover, since the fluorescence condensing sections, such as a lens, can be managed with one piece, it can constitute cheaply and small.

[0042] Furthermore, by allotting a capillary tube pair to one train like this example, arranging each gap space in on a straight line, and irradiating a laser beam along each gap space where a capillary tube does not exist Since laser light does not receive dispersion or refraction by the capillary tube, each gap space can be mostly irradiated with the same same reinforcement and exposure spot size, two or more efficient samples can be excited, and the equipment which detects two or more samples to high sensitivity can be constituted simple. When two or more capillary tubes are put in order without preparing the gap section and same fluorescence detection is performed, In for example, the case so that the two or more same capillary tubes as the conventional example of drawing 6 may be used, the part which removed covering may be arranged in on the exposure shaft of laser light in order and fluorescence detection may be performed Whenever it passes each capillary tube, a laser beam receives dispersion or refraction. A laser beam way bends, or a laser beam bundle spreads, it becomes impossible to irradiate each capillary tube on the same conditions, and sufficient excitation laser beam reinforcement is no longer obtained especially to the capillary tube on the backside. Therefore, it becomes difficult to put two or more capillary tubes in order in such a case. However, in the configuration of this example, even if it puts two or more capillary tubes in order, moreover, all the samples that migrate the inside of each capillary tube can be detected to high sensitivity on the same conditions. Therefore, coincidence measurement of many samples can be attained easily.

[0043] Next, how this equipment determines the base sequence of DNA is explained. With the dideoxy chain termination method of well-known Sanger and others (Sanger), the primer which carried out fluorescent labeling is used, a DNA polymerase reaction is performed, and a fluorescent-labeling DNA fragment is prepared. The primer (indicator primer) which FITC combined is used as a primer. First, annealing (2 chain formation) of the indicator primer is added and carried out to a single stranded DNA, and an indicator primer is combined with a single stranded DNA. This reaction mixture is quadrisectioned and the DNA polymerase reaction corresponding to A, C, G, and T is made to perform to each. That is, ddATP used as four sorts of deoxy nucleotide 3 phosphoric acid (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) and a terminator is added to the single stranded DNA which the indicator primer combined, and a polymerase reaction is made to perform. By this reaction, an end obtains the fluorescent-labeling DNA fragment of the various die length of A. The same reaction is performed also about C, G, and T.

[0044] Four reaction mixture obtained as mentioned above, A, C, G, and T, is introduced into four capillary tubes 27a-27d, respectively. the introducing method -- the 1st example -- the same -- A reaction mixture -- 27a -- G reaction mixture is introduced into 27c, and T reaction mixture is introduced into 27d for C reaction mixture at 27b. Electrophoresis is carried out by impressing the electrical potential difference of about 10kV after installation. Time amount change of with a gaps [each / 29a-29d] fluorescence intensity is measured by making argon laser light with a wavelength of 488nm into excitation light. Since a DNA fragment migrates in order with small molecular weight, it can analyze a base sequence in analyzing the gap location which the fluorescence peak produced to time order.

[0045] The background light reinforcement of this example detected like the 1st example decreases, and it can detect fluorescence intensity to high sensitivity. And two or more samples by the simple equipment configuration are detectable to coincidence. The class of fluorescent substance is changed for every base, each reaction mixture of A, C, G, and T is mixed, it pours into one capillary tube of arbitration, and it becomes possible to measure to coincidence the base sequence of DNA of the equipment configuration which detects time amount change of the fluorescence intensity for every fluorescence wavelength of each fluorescent substance about each of two or more capillary tubes, then many samples.

[0046] [Example 3] Although the 1st example of the above and an example explained [2nd] the equipment which detects a sample by fluorometry, in light absorption measurement of measurement of an absorbance, measurement of transmitted light reinforcement, etc., equipment can be constituted similarly. The block diagram of the electrophoresis apparatus in light absorption measurement is shown in drawing 4 . Two of the capillary tube 52 with a die length of 20cm made from a silica have the capillary tube 51 with the bore of 100 micrometers, an outer diameter [of 200

micrometers], and a die length of 30cm made from a silica and the same diameter of inside and outside as it as a migration way are used. In capillary tubes 51 and 52, 5% polyacrylamide gel containing the urea of a modifier is created. Acrylamide gel was chemically combined with the capillary tube which that of the creation approach of gel is the same as that of the 1st example, and carried out silane coupling processing.

[0047] Each end of these capillary tubes 51 and 52 is held inside the optical cel 54 like the 1st example, and the transmitted light reinforcement based on absorption of a sample is measured. the optical cel (3mm angle of appearances, 1mm angle of inner forms) of the square shape of the 4th page transparence which the vertical edge has released as an optical cel 54 -- using it -- the same configuration as drawing 2 of the 1st example -- it is -- each end of the above-mentioned capillary tubes 51 and 52 -- the interior of the optical cel 54 -- the same axle -- and it holds so that the gap 53 of 0.2mm may be formed.

[0048] Let gap 53 space be an optical detecting element. In addition, each other end of a capillary tube 51 and a capillary tube 52 is dipped in the cathode lateral electrode tub 5 and the anode plate lateral electrode tub 6 which put in the buffer solution (tris, a way acid, buffer solution containing EDTA). The buffer solution is poured into the interior of the optical cel 54, a gap 53 is filled with the buffer solution, and the direct-current high voltage is impressed according to the high-voltage power source 7 between the cathode lateral electrode tub 5 and the anode plate lateral electrode tub 6. By electrical-potential-difference impression, a current flows the inside of a capillary tube 52, a gap 53, and a capillary tube 51, and a sample migrates in a capillary tube 51, a gap 53 and a capillary tube 52, and order.

[0049] Installation of a sample, for example, the restriction enzyme cutting fragment of DNA, dips temporarily the edge of the capillary tube 51 by the side of cathode in a sample solution, and performs the electrical potential difference of 5kV by carrying out grade impression for 10 seconds between a sample solution and an anode plate lateral electrode tub. The edge of a capillary tube is returned to the original cathode lateral electrode tub after that, and by impressing the direct current voltage of 10kV between a cathode lateral electrode tub and an anode plate lateral electrode tub, a sample migrates molecular weight separation being carried out toward an anode plate side from a cathode side in the capillary tube 51 section, passes a gap 53, and is led to a capillary tube 52.

[0050] It is a xenon lamp and D2 to the DNA fragment which passes a gap 53. A monochromator 56 is condensed for the light of the light source 55 of a lamp etc. with through and a lens 57, and a gap 53 is irradiated. Usually it is set as the absorption wavelength of a sample, for example, about 260nm is suitable for the irradiating light wave length to a DNA fragment. It is again condensed with a lens 58 and the light which received light absorption with the DNA fragment and was penetrated is detected by the photomultiplier tube 59. The output signal from a photo-multiplier 59 is amplified with an amplifier 60, a migration pattern etc. is processed with the data processors 61, such as a computer, and those results are outputted to a monitor 62 and a printer 63, and it is saved in memory 64.

[0051] The gap which filled the buffer solution is prepared between capillary tubes like this example, a sample can be efficiently irradiated by dividing with the optical detecting element which measures the molecular weight separation section for the capillary tube section, and measures an absorbance for gap space, without scattering about exposure light by the capillary tube, and highly precise spectrometry becomes possible. If transmitted light reinforcement when carrying out incidence of the light to the gap section like this example is specifically set to 1 (when the numerical aperture of the lens for light-receiving is 0.19 in the case where a sample does not pass), when making a capillary tube penetrate like before, the transmitted light reinforcement will fall about to 0.6. Since gels, such as polyacrylamide gel which is a medium for carrying out molecular weight separation by the capillary tube itself and electrophoresis, are the scatterers of light, this is to scatter about incident light in the part and for the transmitted light to decrease as a result. As for transmitted light reinforcement falling, only the part means that S/Ns, such as a photodetector, fall, and the accuracy of measurement falls. Moreover, on the surface of a capillary tube etc., the reflected light [dispersion and] also carries out incidence of such light to a direct detection machine, without irradiating a sample, although the part will be detected (** which does not receive absorption by the sample). If the amount of [which is detected irrespective of existence of such a sample] Mitsunari is, it will be hard coming to measure a minute change on the strength [optical], that is, spectrometry with a high precision will become difficult.

[0052] In this example, in order that light may pass through gap space, that is, may penetrate the inside of very little buffer solution of light scattering, being influenced of light scattering by the above capillary tubes itself, gels, etc. is lost. Therefore, a sample is irradiated efficiently and highly precise spectrometry becomes possible. In addition, although it condenses in the gap section with a lens and the light which let the monochromator 56 pass is irradiated in this example, irradiating as an parallel light mostly, without condensing, separating spatially only the light which passed the gap section, and measuring the optical reinforcement can measure similarly.

[0053] Moreover, it is also possible to prepare two or more capillary tube pairs like the 2nd example, and to measure absorption of two or more samples to coincidence. In this case, what is necessary is to arrange two or more capillary tube pairs in a perpendicular field, and just to consider as the equipment configuration which detects each transmitted

light reinforcement of two or more gaps by a two-dimensional sensor etc. to the exposure shaft of light.

[Example 4] Although the gap was formed by the capillary tube pair in the 3rd example from the above 1st, a gap is not formed only of a capillary tube pair. For example, the molecular weight separation section can be used as a capillary tube as well as the above-mentioned example, and a gap can also be formed with a plate with this capillary tube edge and pore.

[0054] The expanded sectional view of the fluorescence cel section which formed the gap in drawing 5 with the capillary tube and the plate with pore is shown. The capillary tube 71 filled up with polyacrylamide gel like the 1st example and the plate 73 (for example, plate made of a polytetrafluoroethylene) which has pore 72 are made to counter so that the shaft of a capillary tube 71 and the shaft of pore 72 may be mostly in agreement, it arranges, and a gap 74 is made to form. These are held inside the fluorescence cel 75. A fluorescence cel is a fluorescence cel of the square shape of for example, 3mm angle of appearances and 1mm angle of inner forms which the vertical edge has opened wide, and it presses down with the block 76 made of a polytetrafluoroethylene from the upper part, and is pressed down and fixed with a plate 73 from the lower part, and it enables it to hold the buffer solution etc. in a cel. It enables it to adjust so that the hole which is in agreement with the appearance of a capillary tube 71 may be prepared in the block 76 made of a polytetrafluoroethylene, and a capillary tube 71 may be held through a capillary tube 71 to the hole and the die length of a gap 74 may be set to 1mm from 0.1mm. The other end of a capillary tube 71 is dipped in a cathode lateral electrode tub like the 1st example. Moreover, the tube 77 made of a polytetrafluoroethylene is connected to the lower part of a plate 73 with the tube fastener 78, and it is led to an anode plate lateral electrode tub. In addition, the direct plate 73 may be contacted to an anode plate lateral electrode tub.

[0055] In addition, in drawing 5, although not illustrated, after establishing the inlet for pouring in the buffer solution etc. in the interior of the fluorescence cel 75 like drawing 2, pouring in the buffer solution through a bulb etc. at the time of migration, filling the interior, gap 74 space, and the tube 77 made of a polytetrafluoroethylene of the fluorescence cel 75 and stopping impregnation of the buffer solution, electrophoresis of the sample is carried out. According to this example, fluorescence detection with little background light reinforcement can be performed like the 1st example, and high sensitivity fluorescence detection of a sample is attained.

[0056] Moreover, if two or more pores are arranged on a straight line on a plate 73, the fluorescence cel section which has the same effectiveness as the 2nd example can also be constituted. Moreover, according to this example, since one side is a plate 73, the assembly of equipment becomes easy.

[0057]

[Effect of the Invention] According to this invention, high sensitivity fluorescence with little effect, such as background light, or the electrophoresis apparatus in which light absorption measurement is possible is realizable by performing optical measurement outside the molecular weight separation sections, such as capillary tube gel. Moreover, without spoiling the molecular weight separability ability in gel electrophoresis, the fluorescence or light absorption test section which consists of the electrolytic solution can be constituted simple, and can be instrumentated easily.

[Translation done.]